

野桑蚕 GST-Omega1 基因在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中的表达

马晓英^{1,2}, 李 兵¹, 贡成良¹, 沈卫德^{1,*}

(1. 苏州大学生命科学学院, 江苏苏州 215123; 2. 盐城工学院, 江苏盐城 224000)

摘要: 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 是昆虫的重要解毒酶之一。为了研究野桑蚕 *Bombyx mandarina* 中谷胱甘肽 S-转移酶在真核表达系统中的表达情况。本研究通过 RT-PCR 从野桑蚕中肠中获得 GST-Omega1 基因的 cDNA 序列, 该基因的开放读码框为 771 bp, 编码 256 个氨基酸。对推导的氨基酸序列用 NCBI 的蛋白质 Conserved Domains 工具进行在线分析, 结果显示 GST-Omega1 的氨基酸序列中具有 Cys³⁸ 和 8 个 GSH 结合位点的 Omega 类基因保守序列。对所获得的基因克隆进表达载体 pFastBacHT b 中获得 pFast-GST-Omega1, 将其转化 DH10Bac 感受态细胞, 获得 Bac-GST-Omega1 重组病毒 DNA, 用脂质体法转染草地贪夜蛾 Sf9 细胞, 获得重组病毒。对表达产物经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 能检测到一条分子量约为 33 kD 的特异性条带, 与推导的融合蛋白大小相符, 该目的蛋白的表达量占总蛋白的 14.4%。目的蛋白经 His·Bind 树脂纯化, 用 Lineweaver-Burk 作图法测定其 K_m 和 V_{max} , 结果显示其 K_m 为 2.81 $\mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 2.70 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。

关键词: 野桑蚕; 谷胱甘肽 S-转移酶基因; 克隆; 表达; 杆状病毒表达系统; Sf9 细胞

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2007)10-0996-06

Expression of an omega class glutathione S-transferase gene from *Bombyx mandarina* in the Sf9 cell

MA Xiao-Ying^{1,2}, LI Bing¹, GONG Cheng-Liang¹, SHEN Wei-De^{1,*} (1. School of Life Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Yancheng Institute of Technology, Yancheng, Jiangsu 224000, China)

Abstract: Glutathione-S-transferases (GSTs) were a class of the important xenobiotics-metabolizing enzymes in insects. In this research, a 771 bp GST-Omega1 gene (encoded 256 amino acids) was cloned by RT-PCR from the midgut of *Bombyx mandarina* for exploring the expression profiling of enzyme GSTs in eukaryotic expression system. Analysis by Conserved Domains online tool of NCBI website indicated that the deduced amino acid sequence was comprised of the omega family conserved sequences with one Cys residue and eight GSH binding sites. GST-Omega1 was then cloned into the pFastBacHT b vector, and the recombinant vector was transformed into DH10Bac competent cells to obtain the bacmid DNA. *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells were transfected with the complexes of bacmid DNA and lipofectin to get recombinant baculovirus. The SDS-PAGE and Western blotting results of the expression of recombinant protein showed that a specific band was detected around 33 kD, consistent with the expected size of the fusion protein. The purified target protein by His-Bind resin could catalyze the universal GST substrate CDNB, and exhibited enzymatic activity K_m 2.81 $\mu\text{mol/L}$ and V_{max} 2.70 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$.

Key words: *Bombyx mandarina*; glutathione S-transferases gene; cloning; expression; baculovirus expression system; Sf9 cell

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2005CB121005); 国家自然科学基金项目(30471309)

作者简介: 马晓英, 女, 1976 年 12 月生, 硕士, 研究方向为遗传育种及基因工程, E-mail: jsmxiaoying@hotmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: shenwd@suda.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-04-27; 接受日期 Accepted: 2007-06-19

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 广泛分布于哺乳动物、植物、鸟类、昆虫、寄生虫及微生物体内 (Sheehan *et al.*, 2001; Ketterer, 2001), 不仅能催化生物体内有害的极性化合物与谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 相结合, 而且也可促使体内各种具有潜在毒性的化学药物、染料及某些致癌物排出体外 (Mannervik and Danielson, 1988; Hayes and Pulford, 1995; Eaton and Bammler, 1999; Sheehan *et al.*, 2001)。因此, 一般认为 GSTs 具有多种解毒功能。

GSTs 是一个复杂的广泛分布的超家族, 目前哺乳动物中发现了 8 类细胞质 GSTs 亚基 (Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Zeta, Kappa 和 Omega) 和 1 类微粒体 GSTs 亚基。与哺乳动物一样, 多数昆虫含有多个 GSTs 基因序列 (Aultman *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003)。根据 Chelvanayagam 等 (2001) 提出的命名方法, 昆虫 GSTs 基因被明确划分为 3 类: I 类 GSTs 基因为 Delta 类; II 类为 Omega/Zeta/Sigma/Theta 类 (Sheehan *et al.*, 2001); III 类 GSTs 基因是昆虫特异性的, 称为 Epsilon 类。除了这 3 大类以外, Ranson 等 (2001) 认为昆虫中还存在第 4 类 GSTs 基因。

昆虫的大部分 GSTs 对有机磷 (Motoyama and Danielson, 1980) 和有机氯 (Clark and Shamaan, 1984) 杀虫剂有解毒作用。目前对昆虫 I 类 GSTs 基因的研究相对较多, 基因结构和功能也最为清楚, 在家蝇抗性品系 Cornell-R 中分离的 MdGST-3 基因是有机磷杀虫剂抗性的一个主要因子 (Syvanen *et al.*, 1994)。但对昆虫 II 类和 III 类 GSTs 基因研究相对较少, Ranson 等 (2001) 研究发现在冈比亚按蚊抗性品系中 III 类 GSTs *aggst* 3-2 过量表达 5 倍, 表达的重组酶可以降解 DDT。

野桑蚕 *Bombyx mandarina* 与家蚕 *Bombyx mori* 的血缘关系十分亲近 (吉武成美和蒋猷龙, 1987), 且研究认为野桑蚕由于长期的野外选择, 使其对农药的抗性大于人工驯化的家蚕 (沈卫德等, 2003)。本研究以野桑蚕为材料, 采用 RT-PCR 方法克隆野桑蚕的 GSTs-Omega1 基因的 cDNA 序列, 并用 Bac-to-Bac 系统进行表达, 在此基础上对重组 GST-Omega1 的酶学特征进行了初步研究, 希望有关研究对探讨家蚕抗性的分子进化机制和家蚕农药抗性的分子育种有所帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

野桑蚕采自江苏省苏州市吴江桑园, 室内饲养至 5 龄第 3 天; *E. coli* TG1、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞由苏州大学生命科学学院分子生物学实验室保存; Bac-to-Bac 系统、TRIzol Reagent 和脂质体为 Invitrogen 公司产品; M-MLV RT RNaseH, RNase Inhibitor 为 TaKaRa 公司产品; 胎牛血清为 GIBCOBRL 公司产品; 昆虫细胞培养基 TC-100, 6 × His 一抗和羊抗鼠 IgG-AP 二抗为 SIGMA 公司产品; His·Bind Purification Kit 为 Novagen 公司产品; DNA 胶回收试剂盒及其他试剂均为 BBI 产品。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取: 取 5 龄第 3 天的野桑蚕中肠, 用液氮充分研磨, 转入 2 mL Eppendorf 管。按照 Invitrogen 公司的 TRIzol 使用说明书进行总 RNA 提取, 最后产物保存在 -70℃ 备用。

1.2.2 RT-PCR: 根据 GenBank 公开的家蚕 GST-omega 基因 (GenBank 登录号 DQ355373) 设计如下引物: P1: 5'-CGGGATCCATGTCTGCAATTAAGGAC-3', P2: 5'-CGGAATTCCTTAAATGATTTCAAACA-3', 下划线分别为 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点, 引物由上海生工生物公司合成。

RT-PCR: 第 1 链 cDNA 合成参照 TaKaRa 产品说明书进行。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 50 s, 55℃ 50 s, 72℃ 50 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物的克隆与测序: PCR 产物克隆进 pGEM-T 载体后获得重组质粒 pGEM-GSTo1, 送上海生工生物公司进行测序, 测序结果进行信息学分析。

1.2.4 重组杆状病毒转移载体的构建: 将测序正确的 pGEM-GSTo1 质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 回收 GST-Omega1 片段, 然后克隆进经同样酶切处理的重组杆状病毒转移载体 pFastBacHT b, 获重组杆状病毒转移载体 pFast-GSTo1。

1.2.5 重组病毒转座子的构建: 按照 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 系统说明书, 将鉴定为阳性的重组杆状病毒转移载体 pFast-GSTo1 转化 DH10Bac 感受态细胞中, 涂布于含有 Bluo-gel 100 μg/mL、IPTG 40 μg/mL、Gen 7 μg/mL、Kan 50 μg/mL、Tet 10 μg/mL 的 SOC 平板上, 37℃ 培养 48 h, 挑取白色单菌落, 接种于 3 mL 含有上述 3 种抗生素的 SOC 培养基中, 过夜培养, 然后提取重组 Bacmid (Bac-GSTo1), 同时转化 pFastBac HT b 质粒作阴性对照, 获得阴性 Bacmid (Bac-Fast b), 用位于 Bacmid 中 mini attTn7 两端的 pUC/M13 引物 (P₁: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3';

P₂: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 对重组 Bacmid 进行 PCR 鉴定。阳性重组 Bac-GSTo1 和阴性对照重组 Bac-Fast b 用于转染 Sf9 细胞。

1.2.6 GST-Omega1 基因在昆虫细胞 Sf9 中的表达: 将提取的重组 Bac-GSTo1 和 Bac-Fast b 基因组 DNA 在脂质体介导下分别转染昆虫细胞 Sf9, 28℃ 培养 72 h, 观察细胞病变。细胞出现明显病变后, 取出细胞上清 -70℃ 保存, 同时取一部分病毒液继续感染昆虫细胞 Sf9, 72 h 后收集病变细胞。

1.2.7 SDS-PAGE 和 Western blotting: 收集重组病毒感染 72 h 的病变细胞, 用 PBS (0.1 mol/L, pH 7.4) 洗 2 次, 加 5 倍体积 PBS, 超声波破碎, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 加 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 5 min 后, 进行 SDS-PAGE (15%)。用浸入式电转移法将 SDS-PAGE 电泳凝胶分离样品转移至硝酸纤维素膜上, 然后进行 BSA/PBS 封闭、6 × His 一抗和二抗孵育, 最后 DAB 显色。SDS-PAGE 和 Western blotting 分析参照 Sambrook 等 (1989) 方法。

1.2.8 表达产物的纯化: 收集适量重组病毒感染的病变细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加 2 倍体积 1 × Binding Buffer (His·Bind Purification Kit 配套试剂), 超声波破碎, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清后按 His·Bind Purification Kit 操作手册进行纯化, 纯化蛋白用 SDS-PAGE (15%) 检测。

1.2.9 表达产物的酶活性测定: 参照 Habig 等 (1974) 方法, 以 BSA 为标准蛋白, 用紫外分光光度计测定纯化的重组 GST-Omega1 的蛋白浓度。在 25℃ 下, 取适量的纯化产物, 加 100 mmol/L 的 1-氯-2,4-二硝基苯 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) 和 100 mmol/L 的 GSH 各 30 μL, 最后加入 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 至终体积 3 mL, 于 340 nm 波长处, 用时间驱动程序自动监测其光吸收值在 5 min 内的变化, 按以下公式计算 GSTs 的活力单位 (μmol/min)

$$\text{GSTs 活力单位} = (\Delta\text{OD}_{340} \cdot \nu) / (\epsilon \cdot L)$$

式中, ΔOD_{340} 为每分钟光吸收的变化值; ν 为酶促反应体积 (3 mL); ϵ 为产物的消光系数 (0.0096 L/(μmol · cm)); L 为比色杯的光程 (1 cm)。酶活力单位的定义: 在 25℃, 每分钟催化 1 μmol 的谷胱甘肽参与反应的蛋白含量。最后根据蛋白浓度计算酶比活力。同样的方法, 测定 Bac-Fast b 和 Bac-GSTo1 感染后发病细胞 GSTs 总酶比活力, 分析 GSTs 总酶比活力的变化。

1.2.10 K_m 和 V_{max} 的测定: 在 3 mL 各酶促反应体系 (pH 7.4) 中, 固定加入 100 mmol/L 的 CDNB 30 μL

和适量的线性化产物, 分别加入 100 mmol/L 的 GSH 各 0、20、40、60、80、100 μL, 25℃ 反应 1 min, 三氯乙酸终止反应, 用 Lineweaver-Burk 作图法对纯化后产物进行米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 的测定。每组 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增及重组质粒酶切鉴定

以野桑蚕中肠组织的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增出一条 800 bp 左右的 DNA 条带, 将该片段克隆进 pGEM-T 载体, 获重组质粒 pGEM-GSTo1, 经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切鉴定 (图 1) 和序列分析 (图 2), 结果显示 GST-Omega1 基因的 cDNA 序列已被正确克隆。从鉴定正确的 pGEM-GSTo1 质粒中用 *Bam*H I、*Eco*R I 切出 GSTo1 片段, 克隆进转移载体 pFastBacHT b 中得到重组质粒 pFast-GSTo1, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定 (图 1), 结果显示 GST-Omega1 基因的 cDNA 已正确克隆进 pFastBacHT b 载体。

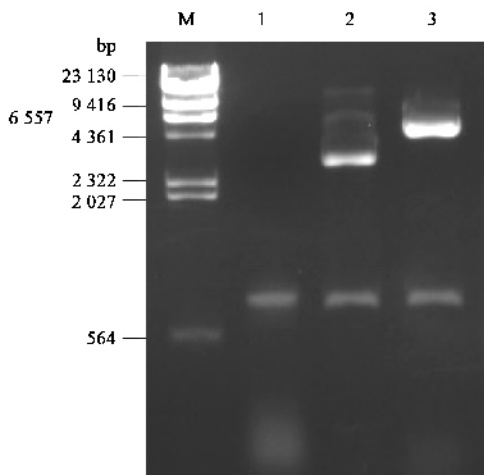


图 1 重组质粒酶切鉴定

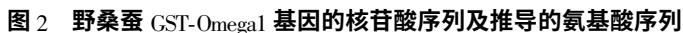
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid

M: Lambda/Hind III marker; 1: RT-PCR 产物 RT-PCR product; 2: 重组质粒 pGEM-GSTo1 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 Recombinant plasmid pGEM-GSTo1 digested with *Bam*H I and *Eco*R I; 3: 重组质粒 pFast-GSTo1 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 Recombinant plasmid pFast-GSTo1 digested with *Bam*H I and *Eco*R I.

2.2 基因序列分析

GST-Omega1 基因 (GenBank 登录号 DQ978378) 的测序结果如图 2 所示。该基因的 ORF 为 771 bp, 编码 256 个氨基酸, 预测蛋白质分子量约为 29.78 kD。将推测的氨基酸序列提交 PSIPRED 网站

保守的半胱氨酸残基(C³⁸),并检测到 8 个 GSH 结合位点(C³⁸、Y⁴⁰、K⁶⁵、K⁷⁷、V⁷⁸、P⁷⁹、E⁹¹、S⁹²)。推测 K⁷⁷、Y⁹⁰、E⁹¹、L⁹³、V⁹⁴、E⁹⁷、K¹²⁰、I¹²¹、E¹²⁴、F¹⁵⁷ 构成了二聚体接触面。与家蚕 Omega 基因(GenBank 登录号 DQ355373)比对其核苷酸序列同源性的 99.5%,氨基酸序列同源性为 99.6%,二级结构和保守序列完全一致。



大写字母为推导的氨基酸序列 Capital italic letters shows the deduced amino acid sequence; 阴影部分为 α 螺旋和 β 折叠 α -helices and β -strands are shadowed; 黑三角示保守的半胱氨酸残基 The solid triangle indicates the conserved cysteine residue at position 38; 加框部分为 GSH 结合位点 The conserved GSH binding site residues are shown in the box; 星号示推测的二聚体接触面 Asterisk indicates the proposed structure of putative dimer interface.

胞(5×10^5 /well),以感染 Bac-Fast b 病毒的细胞作对照,培养 72 h 后,收集细胞,进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。结果如图 4(A,B)所示,在 33 kD 左右出现一条特异性条带,与预计融合蛋白大小相符(GST-Omega1:256 个氨基酸,载体上 26 个氨基酸),说明目的蛋白得到了正确表达。表达产物经 BandScan 图像分析系统分析,目的蛋白占总蛋白的 14.4%。

通过 His·Bind 树脂对目的蛋白进行纯化。纯化产物经 SDS-PAGE 检测,结果如图 4(C)所示,只在 33 kD 左右可检测到特异性条带,说明目的蛋白得到了较好的纯化。

取 Bac-GSTo1,接种 6 孔板中的单层昆虫 Sf9 细

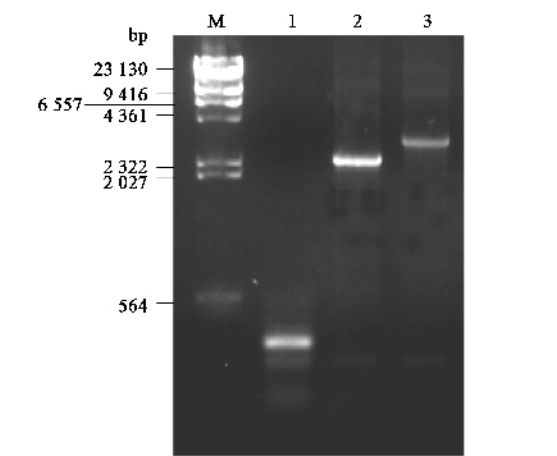


图 3 Bac-GSTo1 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant Bacmid DNA Bac-GSTo1 by PCR

M: Lambda DNA/*Hind* III marker; 1: Bacmid DNA 的 PCR 产物 PCR product from Bacmid DNA alone; 2: Bac-Fast b DNA 的 PCR 产物 PCR product from Bac-Fast b DNA; 3: Bac-GSTo1 DNA 的 PCR 产物 PCR product from Bac-GSTo1 DNA.

酶比活力测定结果如表 1,以 CDNB 为 GSTs 的经典底物,测定的感染 Bac-GSTo1 细胞 GSTs 总酶比活力较感染 Bac-Fast b 细胞 GSTs 总酶比活力提高 18%,说明所表达的 Omega 类 GSTo1 蛋白有着一定的酶活性。同时进一步测定纯化后的 GST-Omega1

蛋白酶活性,其酶比活力为 $0.09 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$,通过 Lineweaver-Burk 作图法测得, K_m 为 $2.81 \mu\text{mol}/\text{L}$, V_{max} 为 $2.70 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

表 1 表达产物 GST-o1 酶活力测定结果

Table 1 Enzymatic activity of the expressed GST-o1

样品 Sample	酶比活力 Enzymatic activity [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]
感染 Bacmid 的 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bacmid	0.16
感染 Bac-GSTo1 的 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bac-GSTo1	0.19
纯化后的重组 GST-Omega1 Purification of recombinant GST-Omega1	0.09

3 讨论

GSTs 是一种球状二聚体蛋白,每个亚基有一个酶催化中心,亚基的多肽链形成两个结构域。N 末端氨基酸结构域由 80 个左右的氨基酸排列形成几个 β 折叠和 α 螺旋,是 GSH 结合位点(G 位点),而且还存在一个相当保守的氨酸残基:在哺乳动物不同类 GSTs 中该氨基酸残基略有不同,如在 Alpha/Mu/Pi 类中为酪氨酸,Theta 类为丝氨酸,Omega 类则为半胱氨酸,在细菌的 Beta 类该位点为半胱氨酸

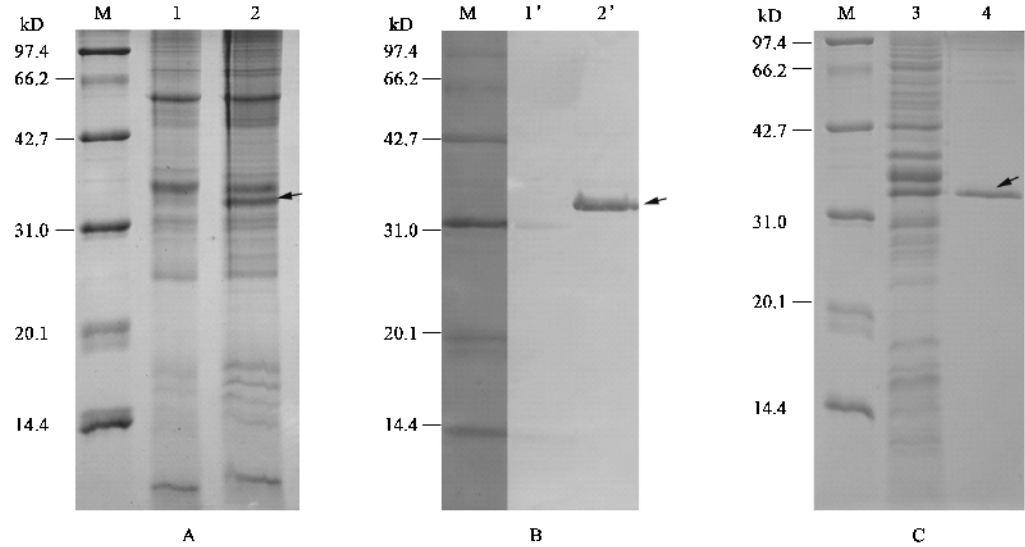


图 4 GST-Omega1 基因在 Sf9 细胞中的表达产物分析

Fig. 4 Analysis of GST-Omega1 gene expression product in Sf9 cell

A: SDS-PAGE 检测 SDS-PAGE analysis; M: 标准分子量蛋白 Protein molecular weight marker; 1: Bac-Fast b 感染 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bac-Fast b; 2: Bac-GSTo1 感染 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bac-GSTo1. B: Western-blot 检测 Western-blot analysis; 1': Bac-Fast b 感染 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bac-Fast b; 2': Bac-GSTo1 感染 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bac-GSTo1. C: 纯化产物 SDS-PAGE 检测 SDS-PAGE analysis of the product of purification; 3: Bac-GSTo1 感染 Sf9 细胞 Sf9 cells infected with Bac-GSTo1; 4: 纯化的 GST-Omega1 蛋白 Purified GST-Omega1 protein.

(Sheehan *et al.*, 2001)。

本研究所克隆的野桑蚕 GST 基因属 Omega 类, 核苷酸序列及推导的氨基酸序列与家蚕该基因序列 (GenBank 登录号 DQ355373) 同源性达 99.5% 和 99.6% 且预测的二级结构和保守序列完全一致。其氨基酸序列在 N-端存在 Omega 类基因绝对保守的半胱氨酸残基 C³⁸ 和 8 个相对保守的 GSH 结合位点。对其进行蛋白质二级结构预测, 发现存在 12 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠, N 端存在 β - α - β - α - β - α 的结构基元, 与哺乳动物 Omega 类 GSTs 一致 (Sheehan *et al.*, 2001)。但与哺乳动物 Omega 类 GSTs C-端为纯 α 螺旋 (Sheehan *et al.*, 2001) 结构有所不同的是, 我们预测的 GST-Omega1 二级结构中 C-端第 6、7 位 α 螺旋中间存在一个 β 折叠, 这一改变是否影响其功能的变化还需进一步研究。

野桑蚕 GST-Omega1 基因在 Bac-to-Bac 表达系统中表达的融合蛋白的氨基酸大小为 282 个 (含载体上 26 个氨基酸), 预测的蛋白大小为 33.2 kD。本实验的 SDS-PAGE、Western-blot 和 His·Bind 树脂纯化的检测结果与预测完全一致, 可见表达产物并没有经过很大的后加工修饰。

值得一提的是, Board 等 (2000) 对哺乳动物 Omega 型 GSTs 研究发现其与其他 GSTs 不同, N 末端伸展与 C 末端邻接形成一个新的结构单位, 它们对经典的 GSTs 底物 CDNB 活性较低, 在大肠杆菌中的表达产物的酶比活力仅 $0.18 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 但有显著的硫醇转移酶 (Thiol transferase) 活力 [$2.92 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]。我们以 GSTs 经典底物 CDNB 对野桑蚕 Bac-GSTo1 基因在 Sf9 细胞中的表达产物进行酶活力测定, 虽然感染 Bac-GSTo1 细胞的 GSTs 总酶比活力较感染 Bac-Fast b 细胞的 GSTs 总酶比活力提高 18%, 其总酶比活力相对较低为 $0.19 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。同样, 纯化后的 GST-Omega1 酶比活力仅为 $0.09 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 因而需进一步测定野桑蚕 Omega 型 GSTs 对谷胱甘肽依赖的硫醇转移酶的活性。

参 考 文 献 (References)

Aultman KS, Gottlieb M, Giovanni MY, Fauci AS, 2002. *Anopheles gambiae* genome: completing the malaria triad. *Science*, 298(5 591): 13.

Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrunk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J, 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the

Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*, 275(32): 24 798 – 24 806.

Chelvanayagam G, Parker MW, Board PG, 2001. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chem. Biol. Interact.*, 133: 256 – 260.

Clark AG, Shamaan NA, 1984. Evidence that the DDT dehydrochlorinase from housefly is a glutathione S-transferases. *Pest Biochem. Physiol.*, 22: 249 – 251.

Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H, 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 4(1): 35.

Eaton DL, Bammler TK, 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.*, 49(2): 156 – 164.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249(22): 7 130 – 7 139.

Hayes JD, Pulford DJ, 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(6): 445 – 600.

Holt RA, Subramanian GM, Halpern A *et al.*, 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5 591): 129 – 148.

Ketterer B, 2001. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem. Biol. Interact.*, 138(1): 27 – 42.

Mannervik B, Danielson UH, 1988. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23(3): 283 – 337.

Motoyama N, Dauterman WC, 1980. Glutathione S-transferases: Their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.*, 2: 49 – 69.

Narumi Y, Jiang YL, 1987. Origin of silkworms and the study of its differentiation. *Agricultural Archaeology*, 14(2): 316 – 324. [吉武成美, 蒋猷龙, 1987. 家蚕的起源和分化研究. *农业考古*, 14(2): 316 – 324]

Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J, 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.*, 359 (Pt 2): 295 – 304.

Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, 360(Pt 1): 1 – 16.

Shen WD, Li B, Ji P, Wei ZG, Chen YH, Pang C, 2003. Adaptability comparison of the *Bombyx mandarina* Moore and *Bombyx mori* L. to the environment. *Science of Sericulture*, 29(4): 375 – 379. [沈卫德, 李兵, 季平, 卫正国, 陈玉华, 庞岗, 2003. 野桑蚕和家蚕的环境适应性比较研究. *蚕业科学*, 29(4): 375 – 379]

Syvanen M, Zhou ZH, Wang JY, 1994. Glutathione transferase gene family from the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.*, 245(1): 25 – 31.

(责任编辑: 黄玲巧)